

Title	Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2
Author(s)	渡辺, 克彦
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46335">https://hdl.handle.net/11094/46335</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 渡 辺 克 彦

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19700 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 年 4 月 28 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 名 Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2  
(ヒト輪部上皮における SP 細胞と ABC トランスポーター ABCG2 の発現)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 田 野 保 雄

(副査)

教 授 不 二 門 尚 教 授 宮 崎 純 一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

角膜は眼球の最前面に位置する透明の組織でバリア機能や光を屈折させる機能を持ち、これらの機能の一部は角膜上皮に依存している。正常の角膜上皮は角膜と結膜の間の輪部に存在する幹細胞が増殖・分化することにより常にターンオーバーを繰り返しているが、アルカリ腐蝕や Stevens-Johnson 症候群などにより幹細胞が失われると角膜表面は混濁した結膜瘢痕組織に被覆される。このような角膜上皮幹細胞疲弊症に対して自己の細胞を用いた培養角膜上皮移植（角膜上皮幹細胞を培養皿の中で分裂増殖させて *in vivo* 角膜上皮と類似した細胞シートを作製し移植する）という再生医療の開発が行われ臨床応用されている。

培養角膜上皮移植において、長期予後の観点からは幹細胞をより多く含む細胞シートを作製・移植することが望ましいが、現在角膜上皮幹細胞の有効な単離法は無い。一方、多くの動物・組織由来の幹細胞が DNA 結合性の蛍光色素である Hoechst 33342 を排出する Side Population (SP) 細胞として分離可能であることが報告されている。角膜上皮幹細胞は輪部上皮基底細胞層に局在することから、本研究ではヒト輪部上皮における SP 細胞の存在と SP 表現型の責任分子であるとされる ABC トランスポーター ABCG2 の発現を検討した。

### 〔 方法ならびに成績 〕

#### ・Hoechst 33342 dye exclusion assay

海外ドナー強角膜片から輪部組織および角膜組織を採取し、それぞれの組織から酵素処理により上皮細胞を採取した。これらの細胞を Hoechst 33342 で染色した後 FACS にて、x 軸側に波長 675 nm の蛍光、y 軸側に波長 450 nm の蛍光の 2 次元解析を行った。その結果、輪部上皮細胞において蛍光強度の低い突出した細胞集団 (SP 細胞群) がみられたが、角膜上皮細胞にこのような細胞集団は存在しなかった。また、この細胞集団は Hoechst 33342 排出の阻害剤であるベラパミルの存在下では消失した。これらの結果から、輪部上皮においても SP 細胞が存在することが明らかとなった。また、抗 ABCG2 モノクローナル抗体および ABCG2 特異的阻害剤の存在下では輪部上皮由来 SP 細胞は著しく減少したことから、輪部上皮細胞における SP 表現型の主たる責任分子は ABCG2 であることが強く示唆された。

#### ・Real-time quantitative RT-PCR analysis

FACSにより輪部上皮細胞からSP細胞およびnon-SP細胞を分離し、total RNAを抽出した。次にTaqMan PCR法によりABCG2 mRNAを定量した結果、SP細胞のABCG2 mRNA発現量はnon-SP細胞と比較して有意に高かった ( $n=4$ ,  $P=0.029$ )。

・免疫組織染色

輪部組織および角膜組織の新鮮凍結切片を作製し、ABCG2 特異的モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った結果、輪部上皮基底細胞層に ABCG2 の発現が認められたが角膜上皮に ABCG2 の発現は認められなかった。この ABCG2 の発現パターンは既報 (Schermer A, *et al.* (1986), Cotsarelis G, *et al.* (1989), Matic M, *et al.* (1997), Pellegrini G, *et al.* (2001)) の角膜上皮幹細胞マーカーの発現パターンと類似しており、また、上述の SP 細胞の分布とも関連していた。

〔 総 括 〕

角膜上皮幹細胞疲弊症に対して従来はドナー角膜を用いたアロ角膜上皮移植が行われていたが、ドナー不足や拒絶反応の問題から、近年、組織工学的手法を用いた培養角膜上皮移植が行われるようになり一定の成果をあげている。しかしながらこの治療法の成績は移植する細胞シートの品質に大きく左右されるため、効率的な幹細胞濃縮法の開発が待望されている。今回我々の研究結果から、ABCG2 が角膜上皮幹細胞を特徴づけている可能性が示唆された。輪部上皮に発現している ABCG2 の生物学的な機能については不明であり更に検討が必要であるが、ABCG2 を細胞表面マーカーとして利用することにより角膜上皮幹細胞を濃縮できる可能性があり、培養角膜上皮移植の成績向上のために有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

下記論文について審査の結果、これを学位に値するものと認める。

(論文内容) 近年、角膜上皮幹細胞疲弊症に対して組織工学的手法を用いた培養細胞シート移植が行われているが、治療成績向上のために効率的な角膜上皮幹細胞濃縮法の開発が待望されている。一方、多くの動物・組織由来の幹細胞が Hoechst 33342 を排出する Side Population (SP) 細胞として分離可能であることが報告されている。角膜上皮幹細胞は輪部上皮基底層に局在するとされることから、本研究ではヒト輪部上皮における SP 細胞の存在と SP 表現型の責任分子であるとされる ABC トランスポーター ABCG2 の発現を検討した。海外ドナー強角膜片から採取した輪部上皮細胞を Hoechst 33342 で染色し FACS にて解析した結果、SP 細胞群が検出され ( $\text{mean}(\%) = 0.3$ ,  $N=6$ )、ABCG2 特異的阻害剤の存在下でこの SP 細胞は著しく減少した。real-time RT-PCR の結果、SP 細胞の ABCG2 mRNA 発現量は non-SP 細胞と比較して有意に高かった。免疫染色の結果、輪部上皮基底層に ABCG2 の発現が認められた。これらの結果から、輪部上皮における SP 表現型の主たる責任分子は ABCG2 でありこの分子が角膜上皮幹細胞を特徴づけている可能性が示唆された。従って、細胞表面マーカー ABCG2 を利用して角膜上皮幹細胞が濃縮できる可能性があり、培養細胞シート移植の成績向上に有用であると考えられた。